

# HLA systém, jeho struktura a funkce

*HLA (Human Leukocyte Antigens) =  
Hlavní histokompatibilní systém  
člověka (MHC)*

# Historie

- ❖ HLA systém je soubor vázaných genů na krátkém raménku chromozomu 6
- ❖ MHC geny nejdříve rozpoznány u myší na základě pokusů s transplantacemi tumorů u myší (1930-1940)
- ❖ 70. léta - již známy 3 lokusy I. třídy HLA-A, -B, -C
  - HLA antigeny definovány sérologickými a buněčnými technikami
  - účast HLA molekul v imunitní odpovědi
- ❖ 1974- fenomén HLA restrikce ( T lymfocyty rozpoznávají cizorodý antigen pouze v komplexu s HLA molekulami I. nebo II. třídy)
- ❖ 80. léta- objev lokusů II. třídy HLA-DR, -DQ, -DP
- ❖ 90. léta- objev tzv. neklasických antigenů lokusů HLA-E, -F, -G, -H, -J, -K, -X
  - zavedeny techniky HLA typizace na úrovni DNA

# Struktura HLA systému

- ❖ Nejkomplexnější a nejpolymorfnější systém, každý člověk nese unikátní sestavu HLA alel, výjimka – monozygotní dvojčata
- ❖ lokalizace na krátkém raménku 6. chromozomu ( 4100 kb, více než 200 genů )
- ❖ geny uspořádány do 3 oblastí: **HLA I., II., III. třída**

## **HLA I. třída (transplantační, klasické antigeny)**

- ❖ I. třída obsahuje geny **HLA –A, -B, -C** pro těžký řetězec  $\alpha$  HLA molekul
- ❖ povrchové glykoproteiny, exprimovány na téměř všech buňkách
- ❖ neklasické geny HLA-E, -F, -G (glykoproteiny - omezený výskyt)
- ❖ pseudogeny

## HLA II. třída

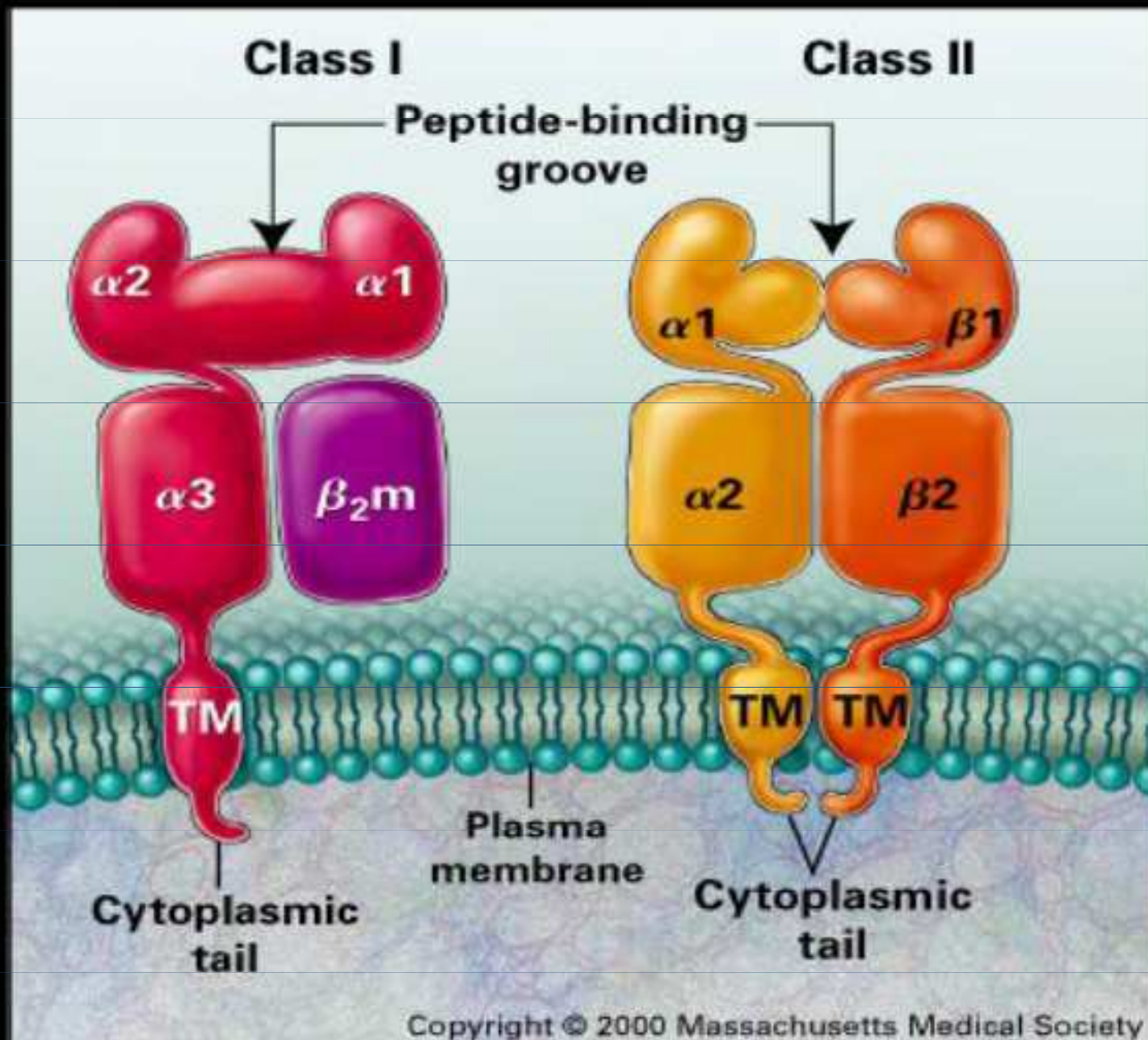
- ❖ geny pro  $-\alpha$  a  $-\beta$  řetězec HLA molekul – **DR, -DQ, -DP**
- ❖ produkty glykoproteiny exprimovány na povrchu tzv. antigen prezentujících buněk (buňky imunitního systému)
- ❖ **HLA-DM, -DO** geny – produkty výskyt v endozomech, funkce - naložení cizorodého peptidu na HLA molekulu II. třídy)
- ❖ geny **LMP2, LMP7** kódují proteiny, které štěpí cizorodé částice na menší peptidy
- ❖ geny **TAP1, TAP2**, zahrnuty do procesu transportu peptidů do ER

## HLA III. třída

- ❖ strukturálně a funkčně odlišné proteiny
- ❖ složky komplement C4, C2, faktor B, 21-hydroxylasa, TNF, heat shock protein Hsp 70

# Struktura HLA molekul

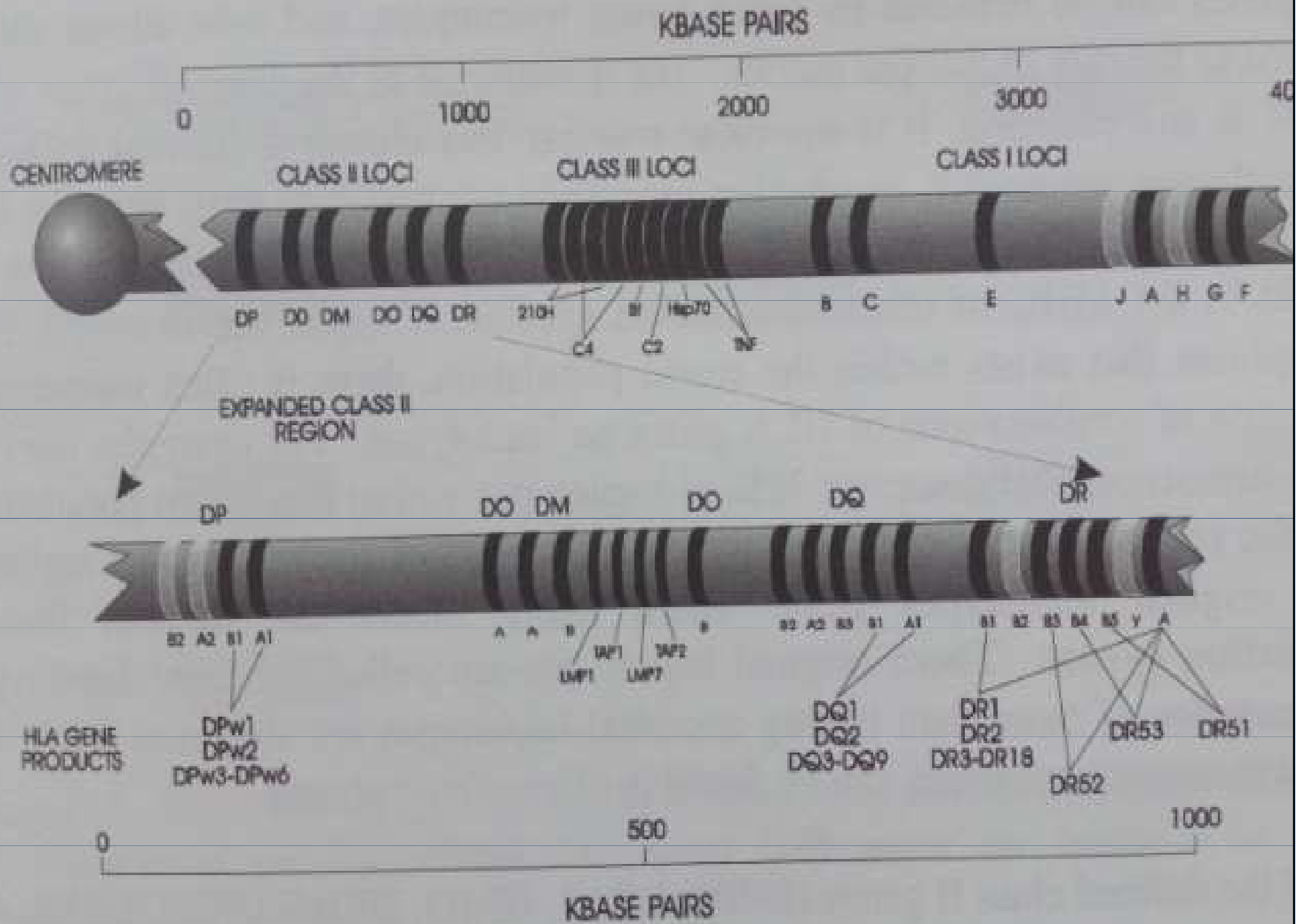
- ❖ HLA molekuly I. a II. třídy jsou glykoproteiny složené ze 2 různých proteinových řetězců (heterodimery)
- ❖ HLA molekuly I. třídy mají těžký  $\alpha$ - řetězec nekovalentně vázaný s  $\beta$ 2-mikroglobulinem (gen pro lehký řetězec  $\beta$ 2- mikroglobulin lokalizován na chr. 15)
- ❖  $\alpha$ - řetězec vytváří 3 domény  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3
- ❖  $\alpha$ 1 a  $\alpha$ 2 vytváří vazebný žlábek pro cizorodý peptid
- ❖ HLA molekuly II. třídy se skládají ze 2 glykoproteinových transmembránových řetězců  $\alpha$ ,  $\beta$
- ❖ Každý řetězec je složen do 2 domén -  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2
- ❖  $\alpha$ 1,  $\beta$ 1 vytváří vazebný žlábek pro cizorodý peptid



Klein J, Sato A. The HLA System. First of two parts. N Engl J Med 2000;343:702-9.



The New England Journal of Medicine



# Polymorfismus HLA - počet alel stále roste

Lokus	Počet alel	Proteiny
HLA-A	6921	4156
HLA-B	8181	5090
HLA-C	6779	3927
HLA-E	271	110
HLA-F	45	6
HLA-G	88	26
HLA-DRB1	3018	2063
HLA-DQB1	2033	1324
HLA-DPB1	1862	1180

<http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>



# Funkce HLA systému

- ❖ Primární role imunitního systému je rozpoznat a eliminovat nebezpečné cizí agens, imunitní systém musí **rozlišovat mezi „vlastními“ a „cizími“ antigeny**
- ❖ Hlavní funkcí HLA molekul je předkládat (prezentovat) cizí antigeny buňkám imunitního systému, především T lymfocytům
- ❖ Tato prezentace antigenu je prvním předpokladem pro rozvoj imunitní reakce a tím obrany proti napadení mikroorganismy
- ❖ fenomén **HLA restrikce** - buněčné receptory T lymfocytů (TCR) rozpoznávají cizí peptidy pouze vázané v peptidovém žlábků HLA molekuly I. nebo II. třídy
- ❖ 2 způsoby prezentace antigenů T lymfocytům – endogenní (HLA I. tř.)  
- exogenní (HLA II. tř.)

# ENDOGENNÍ ZPŮSOB PREZENTACE

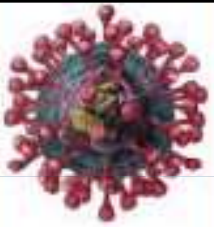
- ❖ HLA molekuly I. třídy
- ❖ rozpoznání a destrukce virem infikovaných bb.
- ❖ cizorodé peptidy prezentované molekulami HLA I. tř.  
odvozené od proteinů produkovaných buňkou - **endogenní zdroj**
- ❖ cizorodý peptid + HLA I. tř. → CD8+ (Tc lymfocyty) - zabití napadených buněk

# EXOGENNÍ ZPŮSOB PREZENTACE

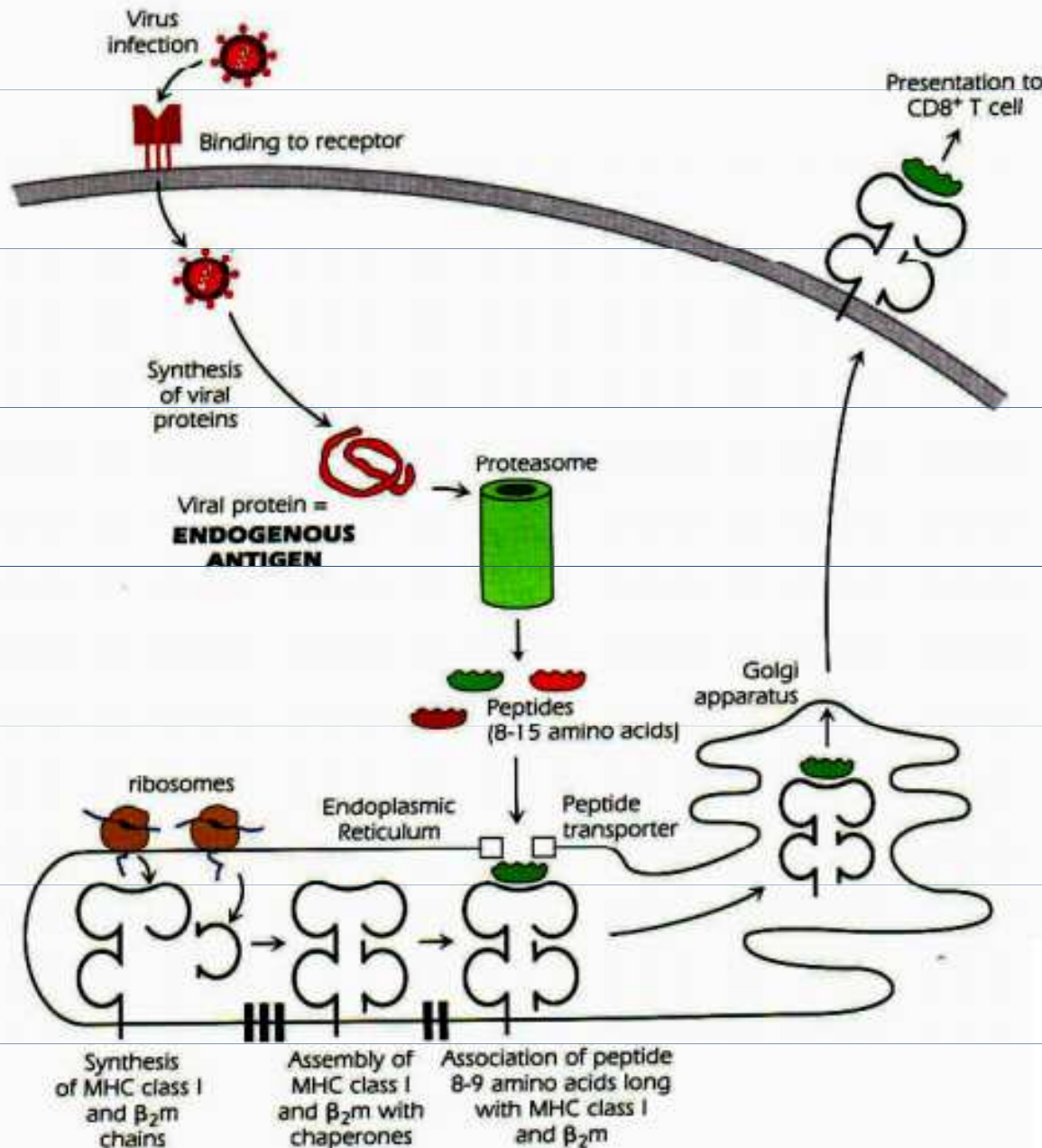
- ❖ HLA molekuly II. třídy
- ❖ vesikulární systém buňky (transportní váček)
- ❖ exogenní antigeny jsou buňkou pohlcené (endocytóza, endozóm) - bakterie, paraziti - **exogenní zdroj**
- ❖ endosom fúzuje s lysosomem (štěpení proteinu)
- ❖ fúze endolysozomu s transportním váčkem s HLA II. molekulami
- ❖ MHC class II loading compartments (MIICs) – naložení peptidu
- ❖ ciz. peptid + HLA II  $\longrightarrow$  CD4+ (Th lymfocyty) - aktivace zánětlivé a protilátkové odpovědi

CD4+ Th1 - zánětlivé - aktivace makrofágů k zabití patogenu

CD4+ Th2 - protilátková odpověď, aktivace B buněk k produkci protilátek



# Peptidy prezentované pomocí HLA I. tř. – endogenní zdroj



1. Syntéza virových proteinů na ribosomech
2. Ubiquitin – označení proteinu k likvidaci
3. Proteasom = proteinový komplex k rozštěpení nepotřebných a poškozených proteinů
4. TAP1/TAP2 – transport peptidů do endoplasmatického retikula
5. Naložení na molekulu HLA I a transport na povrch buňky

# Peptidy prezentované pomocí HLA II. tř. – exogenní zdroj

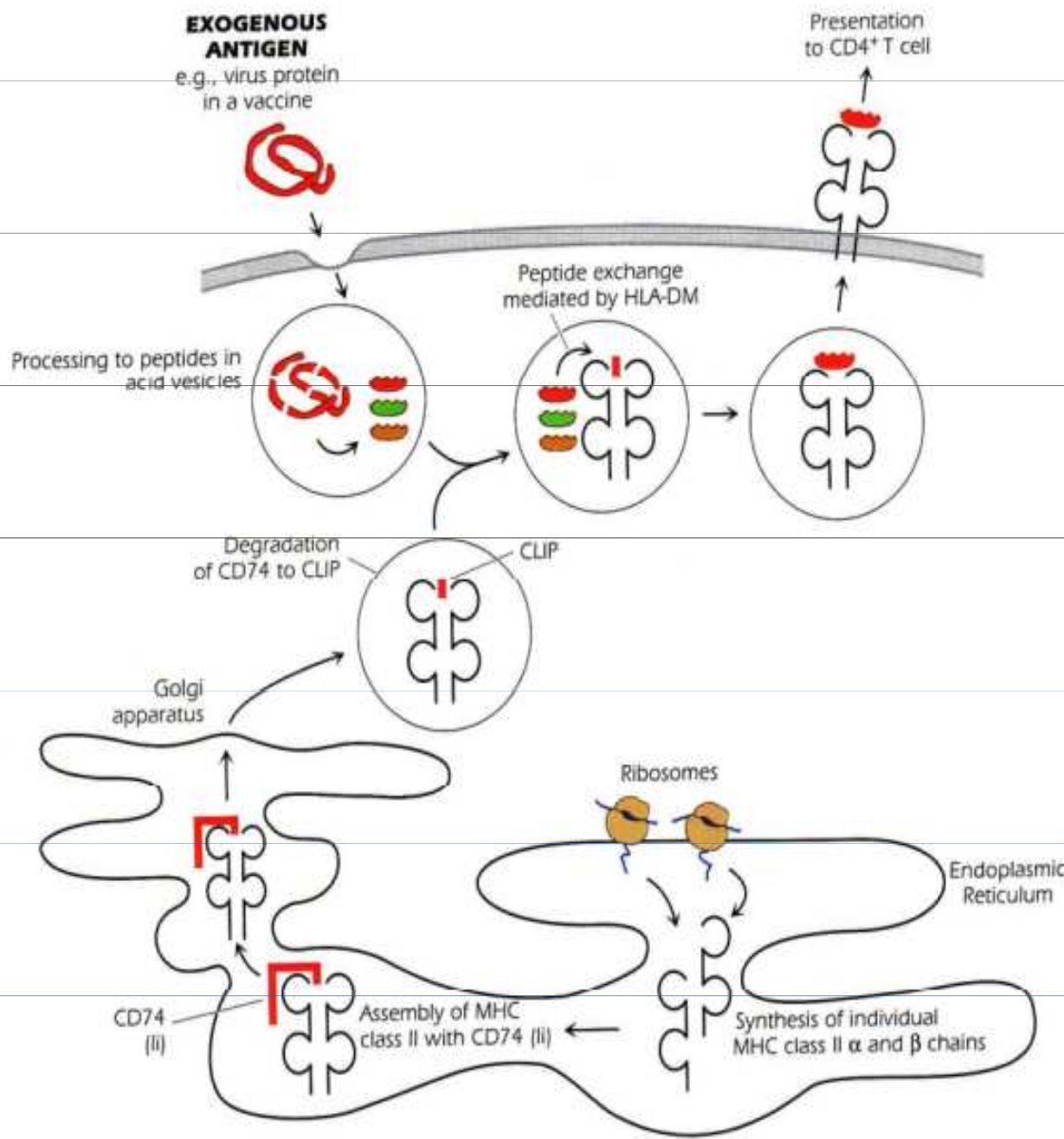
## EXOGENNÍ ANTIGEN

Vesikuly s kyselým prostředím  
ENDOSOMY  
LYSOSOMY - proteolytické štěpení  
(katepsiny, endopeptidáza)

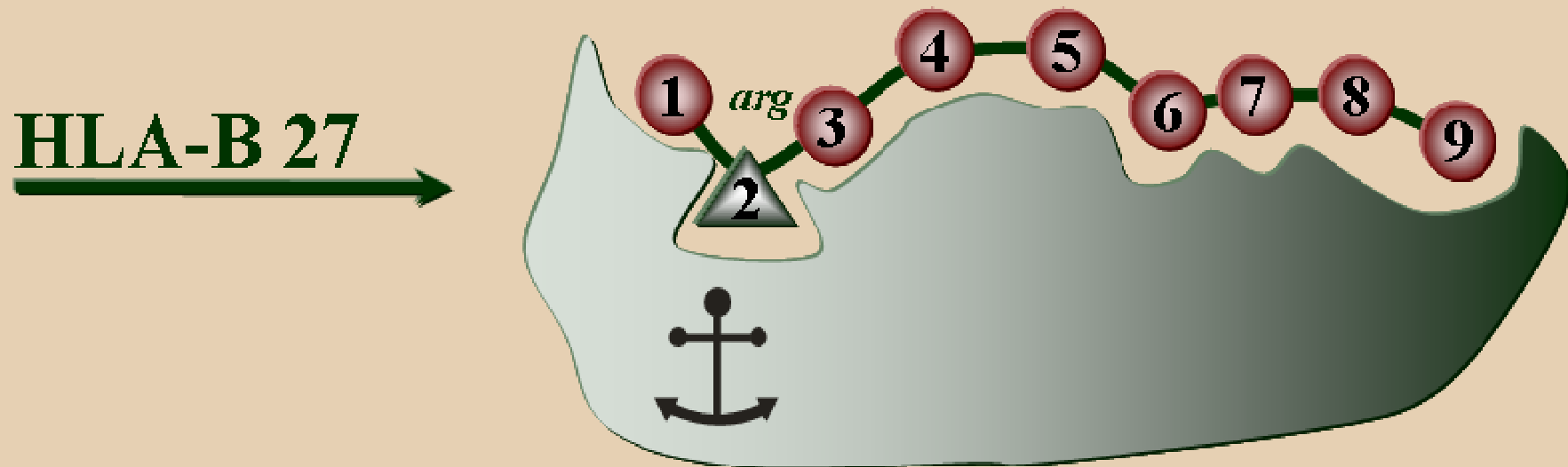
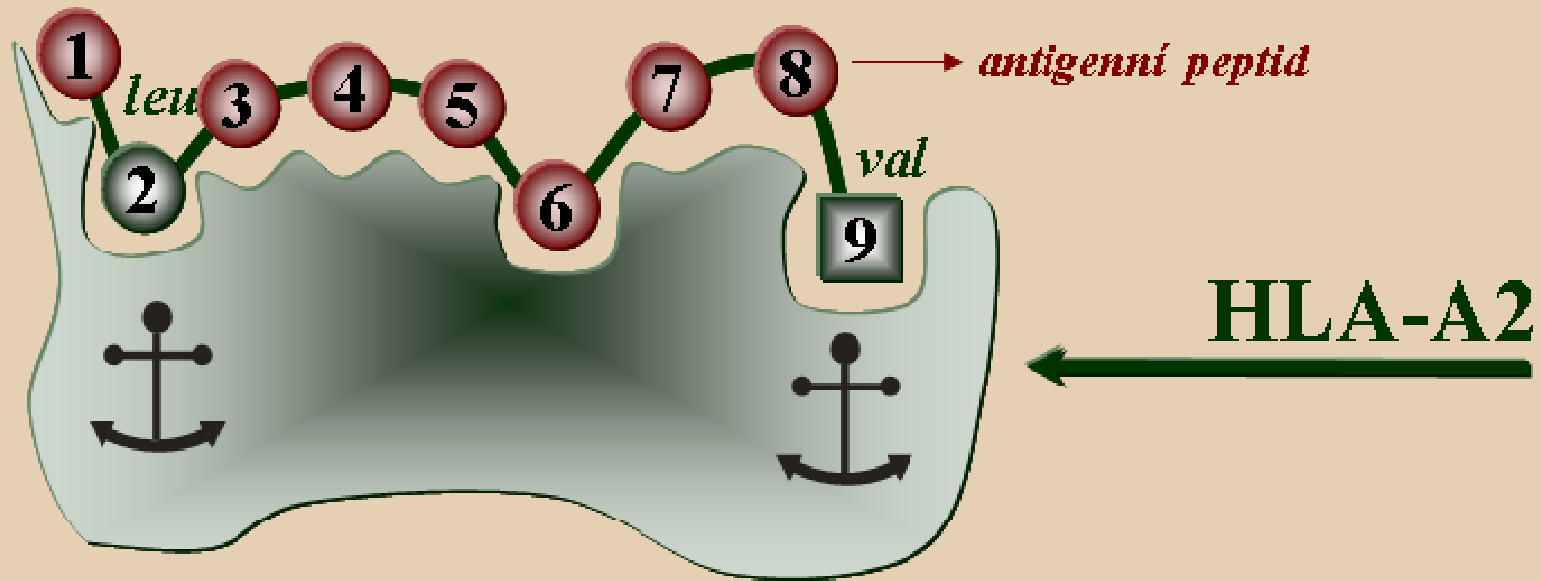
## MHC II

## ENDOPLASMATICKÉ RETIKULUM

$\alpha$  a  $\beta$  řetězec MHC II + invariantní řetězec (Ii, CD74)  
(zabraňuje obsazení vazebných míst vlastními peptidy)  $\Rightarrow$  CLIP (CLass II associated Invariant Chain Peptide)  
 $\Rightarrow$  HLA-DM  $\Rightarrow$  odstranění Ii a záměna za antigenní fragment



# VAZBA ANTIGENNÍCH PEPTIDŮ NA MOLEKULY HLA I



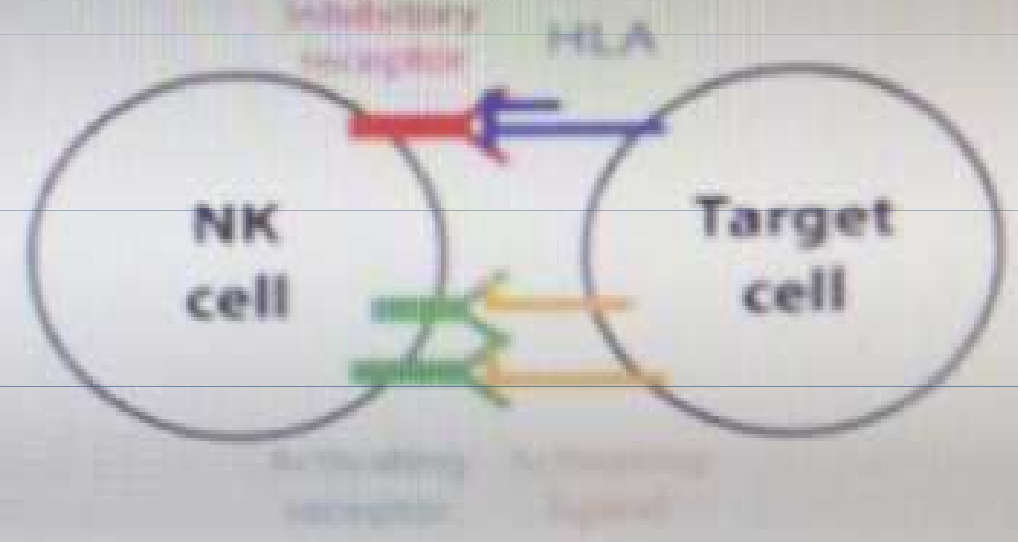
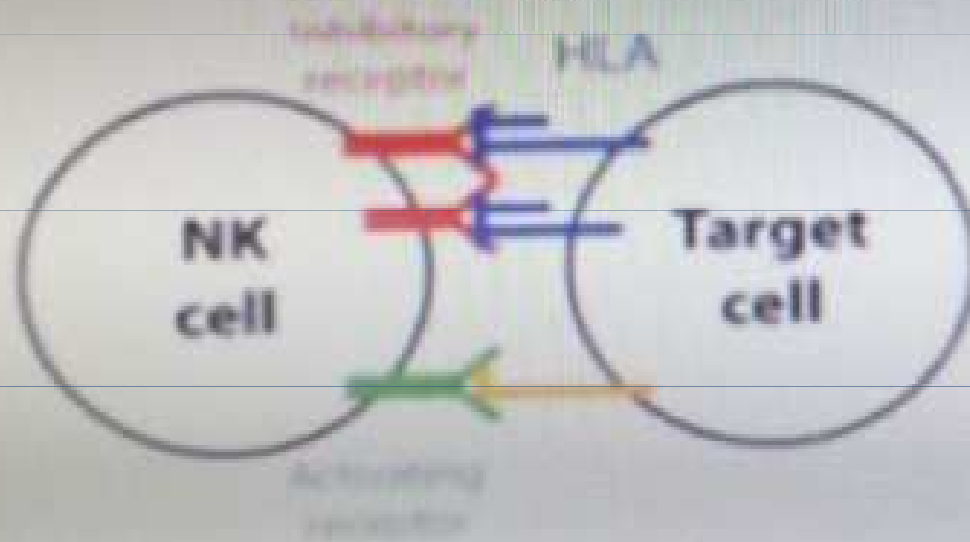
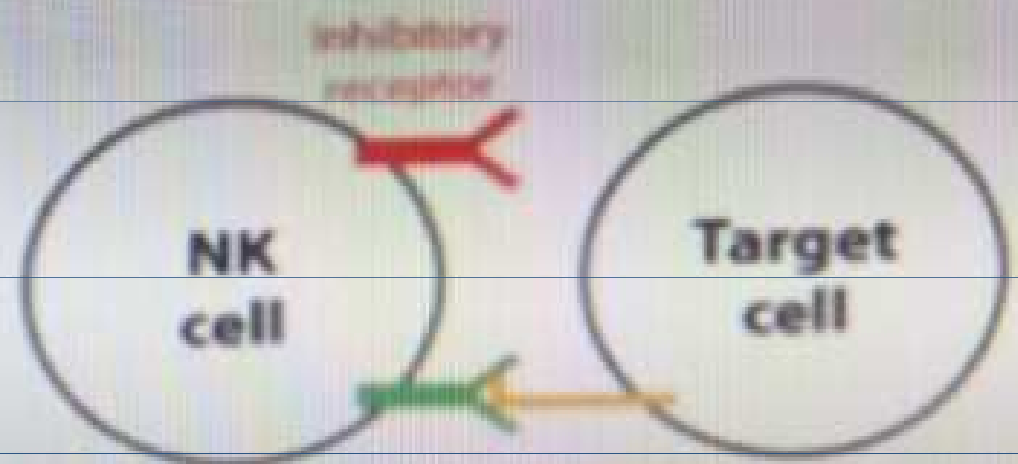
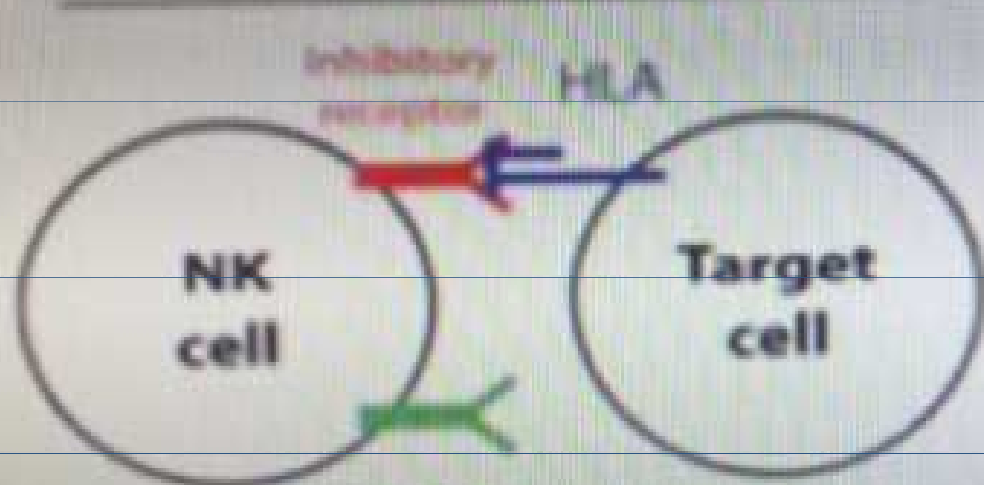
## HLA molekuly jsou ligandy pro receptory NK buněk

- ❖ NK buňky (přirození zabíječi), obrana proti infekcím
- ❖ NK buňky mají na povrchu **aktivační a inhibiční receptory**, kterými je regulována aktivita NK buněk
- ❖ Inhibiční receptory rozpoznávají HLA molekuly a také neklasické HLA-E a -G molekuly
- ❖ **HLA molekuly aktivují nebo blokují aktivitu NK buněk**
- ❖ T lymfocyty rozpoznávají přítomnost HLA molekul (vlastní x cizí)
- ❖ NK buňky rozpoznávají absenci HLA molekul na povrchu buňky (nádorové b., virem infikované b.)

# Regulace aktivity NK buněk

NO LYSIS

LYSIS



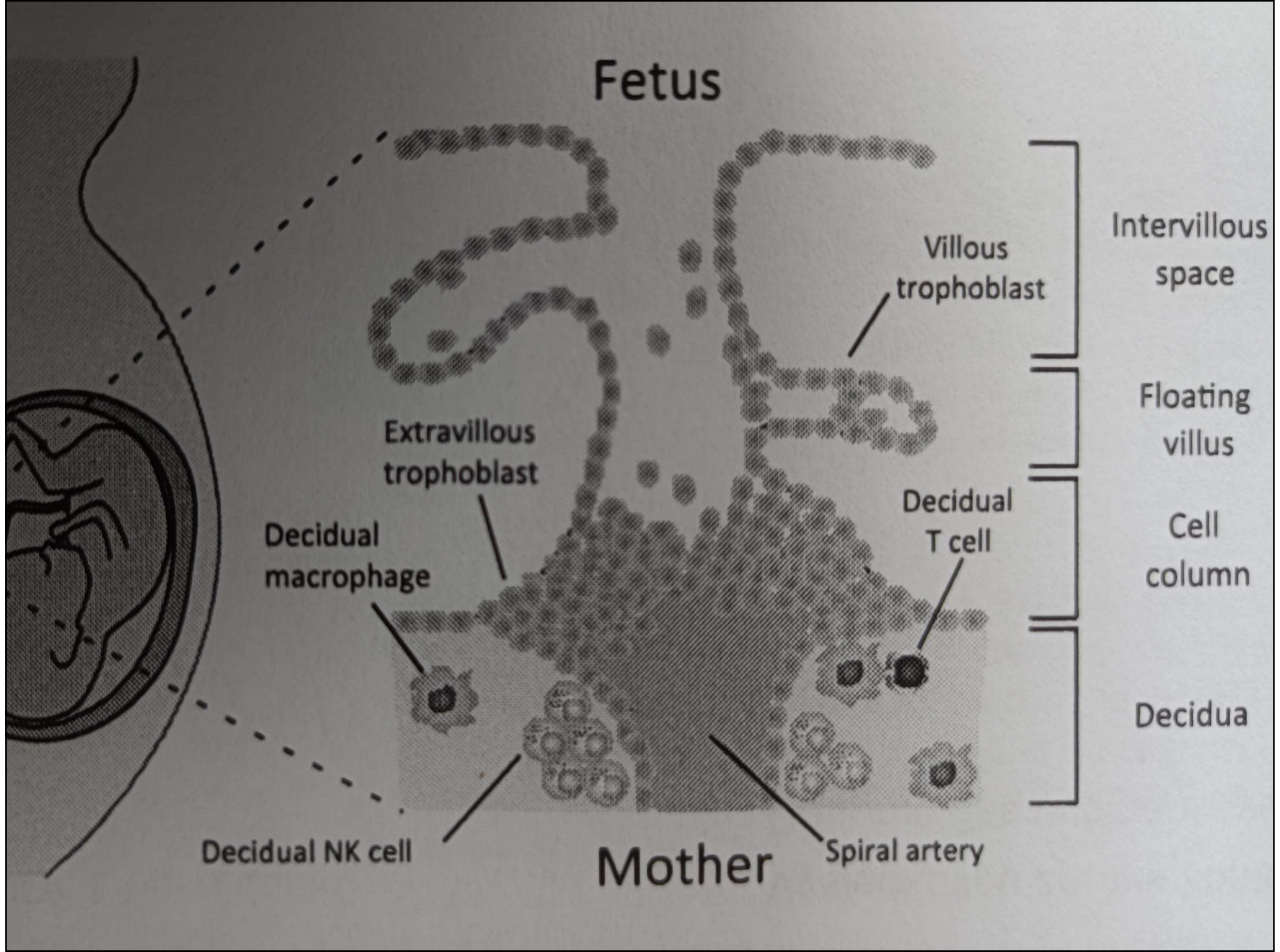


## Ochrana fetálního allograftu

- ❖ Plod v těle matky je z poloviny cizí štěp
- ❖ Klasické HLA produkty I. třídy –A, -B, nejsou exprimovány na buňkách trofoblastu → T lymfocyty jsou k plodu ignorantní
- ❖ na trofoblastu jsou syntetizovány HLA-C a neklasické molekuly HLA-G, (-E) → zajišťují inhibici NK buněk
- ❖ Závěr: Neklasické HLA-G, (-E) molekuly hrají speciální biologickou roli = ochrana vyvíjejícího se fetu před mateřskými T a NK buňkami, hrají roli při potlačení imunitní odpovědi matky proti plodu – navození tolerance

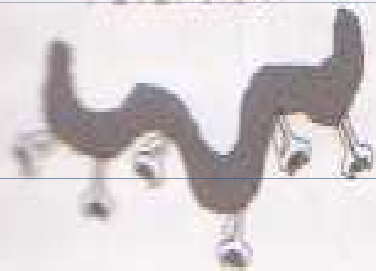
## úloha HLA molekul v transplantologii

- ❖ HLA molekuly jsou silné aloantigeny indukující rejekci štěpu



# Trophoblast

Fetal Side

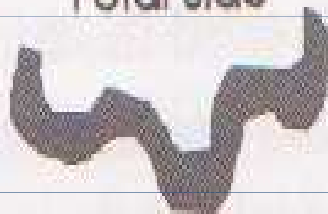


A. Normal HLA Tissue Distribution



T Cell  
Activation

Fetal Side



B. No HLA Class I Molecules



NK Cell  
Activation

Fetal Side



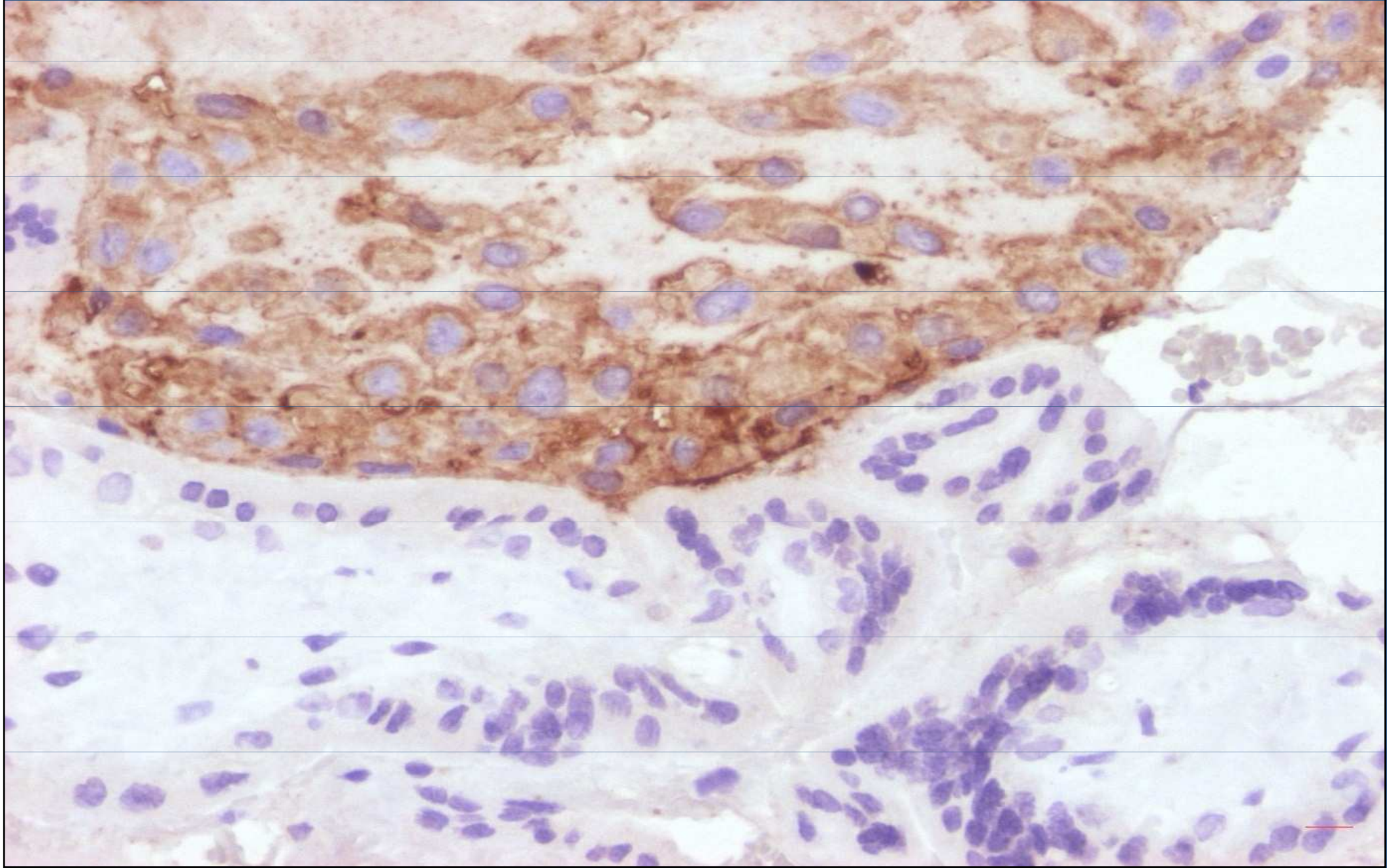
C. Specialized HLA Class I (HLA-E, -G)



No T or NK Cell  
Activation

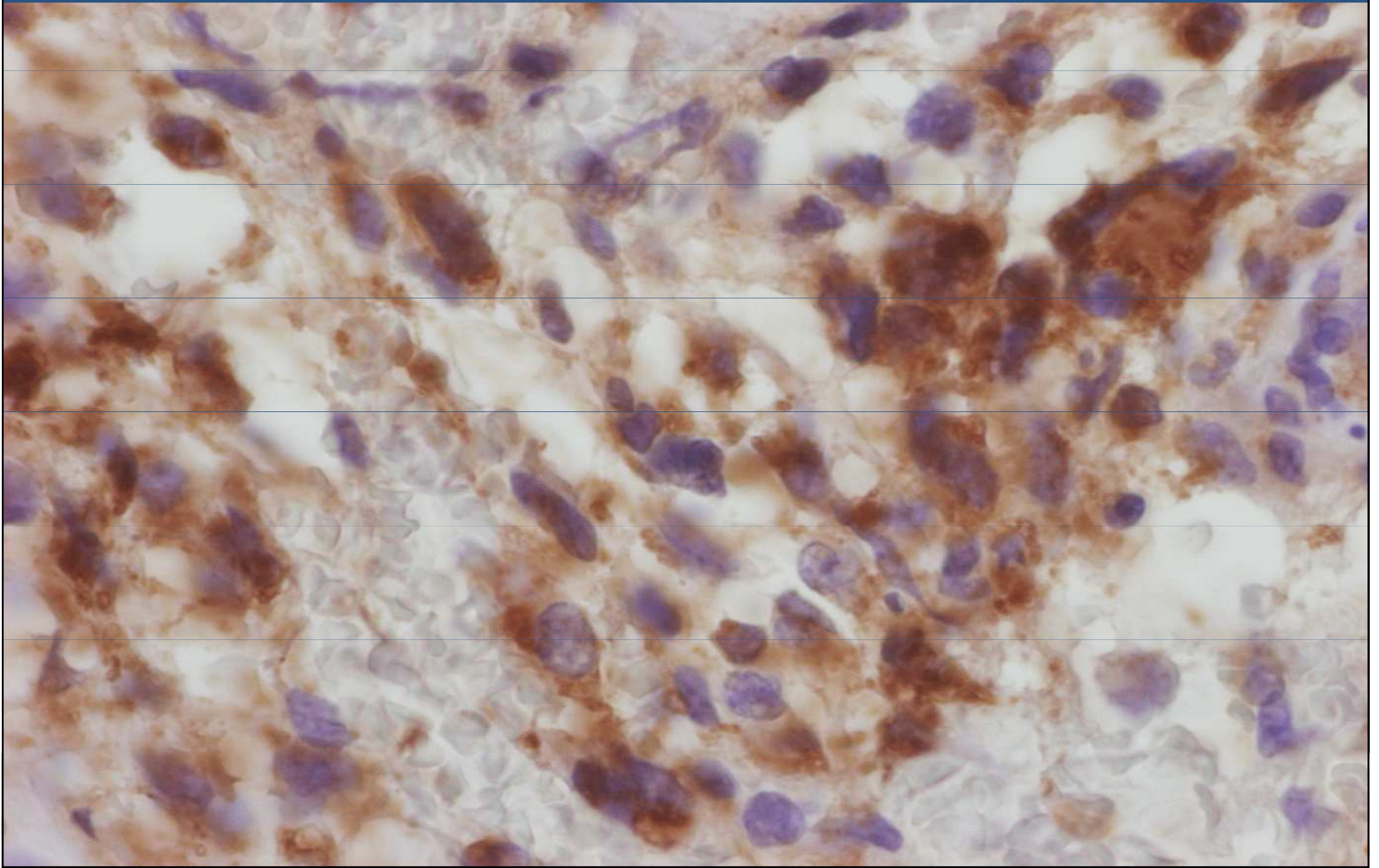


# Placental trophoblast cells – HLA – E, G





Glioblastoma neoplastic cells– HLA –E, 400x



# Expresce a distribuce HLA molekul

- ❖ HLA I. tř. - nalezeny na všech jaderných buňkách
- ❖ HLA geny exprimovány kodominantně – obě alely každého HLA lokusu exprimují HLA molekuly
- ❖ na mladých červených krvinkách – atypický antigenní systém **Bga, Bgb, Bgc** (**reziduální HLA antigeny**)
- ❖ plazma – solubilní HLA antigeny
  
- ❖ HLA II. tř. – omezená distribuce: B lymfocyty, makrofágy, dendritické buňky, Langherhansovy buňky kůže, (buňky imunitního systému)
  
- ❖ exprese HLA antigenů I. a II. třídy může být zvýšena během zánětu, ale také může být indukována na určitých buňkách, na kterých se normálně neexprimují (myocyty, hepatocyty).
- ❖ Zvýšená nebo nová exprese HLA antigenů je iniciována cytokiny (interferony)
  
- ❖ Nová exprese HLA antigenů za určitých podmínek pravděpodobně hraje majoritní roli v patogenezi rejekce transplantovaného štěpu
- ❖ Snížená exprese HLA molekul - nádorové buňky, virem infikované buňky
  
- ❖ Absence HLA molekul - mechanismus, kterým nádorové buňky a virem infikované buňky obcházejí imunitní rozpoznání T buňkami.

typ buňky, tkáň	exprese	
	HLA I	HLA II
<b>BUŇKY IMUNITNÍHO SYSTÉMU</b>		
<b>dendritické buňky</b>	+++	+
<b>makrofágy</b>	+++	++
<b>T lymfocyty</b>	+++	+
<b>B lymfocyty</b>	+++	+++
<b>JINÉ JADERNÉ BUŇKY</b>		
<b>neutrofilní granulocyty</b>	+++	-
<b>eosinofilní granulocyty</b>	+++	-
<b>epitelové buňky</b>	+++	-
<b>hepatocyty</b>	+	-
<b>nervové buňky</b>	+	-
<b>buňky ledvin</b>	+	-
<b>NEJADERNÉ BUŇKY</b>		
<b>trombocyty</b>	++	-
<b>erytrocyty</b>	-	-

Tab.1.: Odlišnosti v expresi molekul HLA I. a II. třídy na různých buněčných typech  
( J. Krejsek a O. Kopecký, Klinická imunologie, str. 125, 2004)

# Srovnání vlastností a funkce HLA I a HLA II

Charakteristika	HLA I	HLA II
Struktura	$\alpha$ řetězec + $\beta$ 2m	$\alpha$ a $\beta$ řetězce
Domény	$\alpha$ 1, $\alpha$ 2 a $\alpha$ 3 + $\beta$ 2m	$\alpha$ 1, $\alpha$ 2 a $\beta$ 1, $\beta$ 2
Buněčná exprese	téměř všechny jad.buňky	APC (B buňky, dendritické buňky, makrofágy)
Peptidy vázající místo	uzavřené, váže 8-9 amk tvořené doménami $\alpha$ 1 a $\alpha$ 2	otevřené, váže 12-17amk tvořené doménami $\alpha$ 1 a $\beta$ 1
Peptidy	endogenní antigeny	exogenní antigeny
Peptidy prezentované	CD8+T buňkám	CD4+T buňkám



## Dědičnost HLA systému

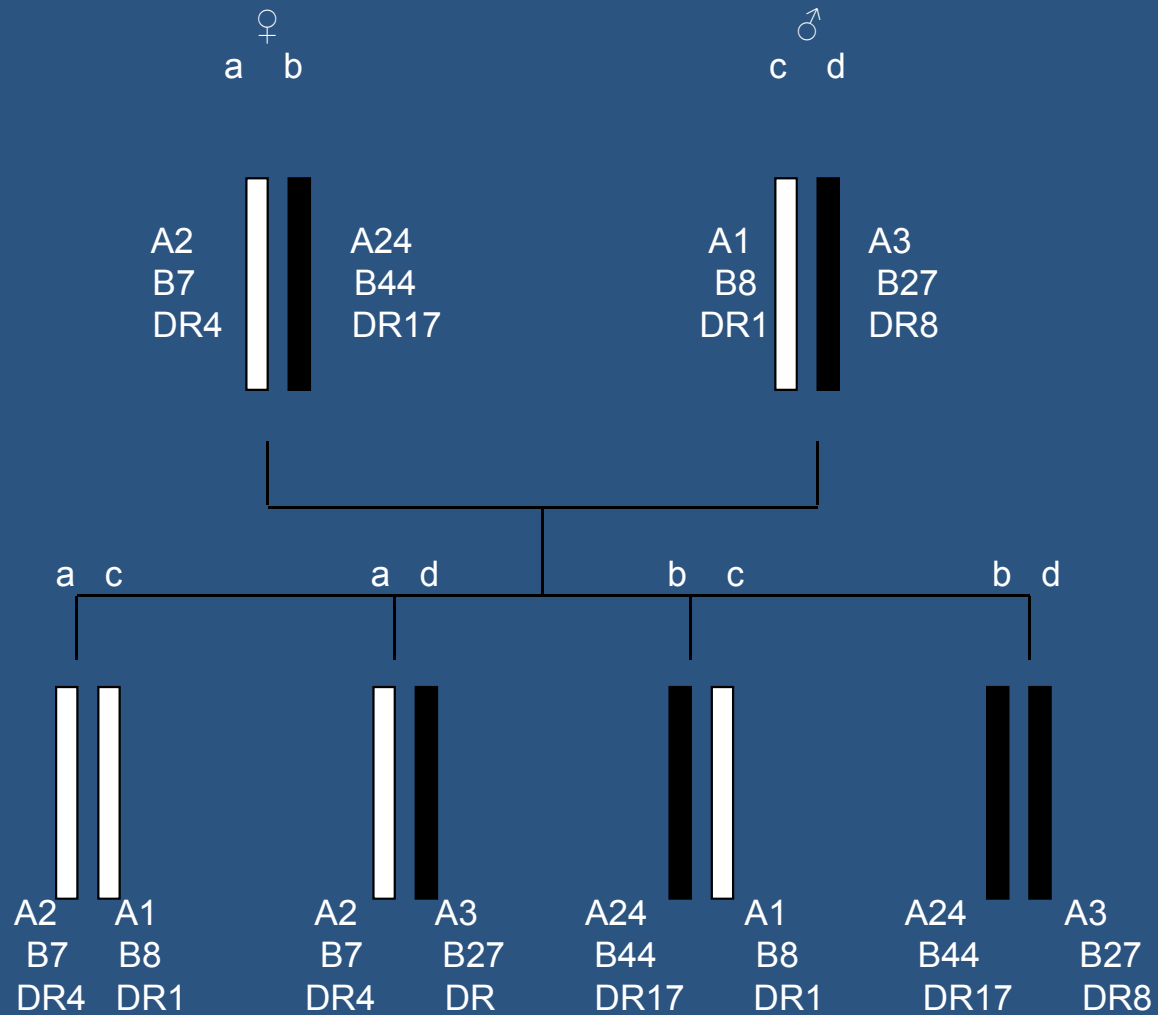
- ❖ geny vázané X geny volně kombinovatelné
- ❖ HLA geny jsou vázané → děděny „en bloc“ od rodičů jako haplotyp
- ❖ někdy rekombinace v HLA oblasti (crossing-over během meiotického dělení) → výměna genetického materiálu mezi homologickými chromozómy → vznikají rekombinantní sestavy alel
- ❖ frekvence rekombinace je závislá na vzdálenosti mezi geny
- ❖ vazebná nerovnováha ( linkage disequilibrium )
  - běžná v HLA systému
  - určité kombinace alel se vyskytují častěji, než by se očekávalo na základě genových frekvencí
- ❖ evoluční základ vazebné nerovnováhy je spekulativní, určité kombinace HLA alel asi poskytují v některých populacích určitou selekční výhodu

Např. **HLA-A1** a **HLA-B8** s genovými frekvencemi **0,16** a **0,1** v populaci. Očekávaná frekvence výskytu haplotypu **HLA –A1, B8** v populaci by měla být  **$0,16 \times 0,1 \times 100\% = 1,6\%$** . V některých kavkazských populacích frekvence tohoto haplotypu zdaleka přesahuje očekávanou frekvenci ( **8%** )

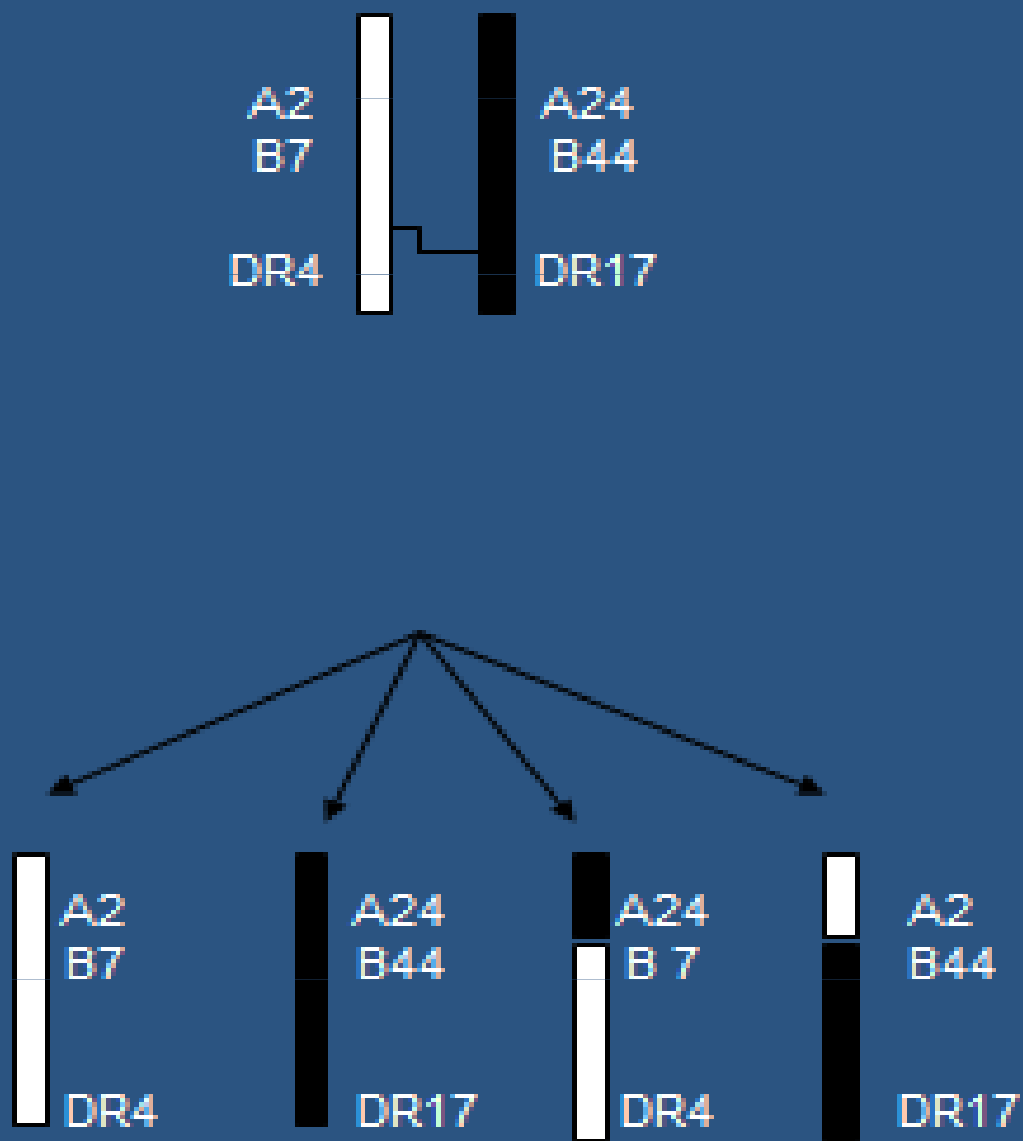
# Nejčastější haplotypy v různých etnických skupinách

	<u>African</u>	<u>Asian</u>	<u>Caucasian</u>
	Haplotype (freq.%)		
1.	A30,B42,DR3 (1,67)	A33,B58,DR3 (1,58)	<b>A1,B8,DR3 ( 5,18)</b>
2.	A1,B8,DR3 (1,25)	A33,B44,DR6 (1,46)	<b>A3,B7,DR2 (2,63)</b>
3.	A3,B7,DR2 (0,76)	A24,B52,DR2 (1,38)	<b>A2,B44,DR4 (2,15)</b>
4.	A2,B44,DR4 (0,65)	A2,B46,DR9 (1,35)	<b>A2,B7,DR2 (1,8)</b>
5.	A33,B53,DR8 (0,63)	A33,B47,DR7 (1,34)	<b>A29,B44,DR7 (1,47)</b>

# Dědičnost HLA haplotypů



# Vznik nerekombinantních a rekombinantních HLA haplotypů



## HLA asociovaná onemocnění

- ❖ 1967 – první zprávy o asociaci HLA systému s onemocněním u člověka
- ❖ 1973 – objevena asociace **HLA-B27 s ankylozující spondylitidou** (m. Bechtěrev)
- ❖ následně byly studovány stovky onemocnění pro možnou asociaci onemocnění s HLA systémem
- ❖ u více než 50-ti onemocnění byla prokázána statisticky významná HLA asociace
- ❖ HLA asociované choroby jsou nemaligní chronická onemocnění
- ❖ převážně autoimunitní onemocnění
- ❖ většina chorob je multifaktoriálních ( geny+ environmentální složka)
- ❖ spouštěčem často environmentálním faktory (mikroorganismy, stres)

## Některé příklady asociace HLA alel s chorobou:

Birdshot retinopathy	-A29	RR=200
Ankylosing spondylitis	-B27	81,8
Narcolepsy	-DQB1*06:02	100
Psoriasis vulgaris	-B13, Cw6	4,5 7,2
Celiac disease	- DQB1*02, DQA1*05 (DQ2.5) - DQB1*03:02, DQA1*03:01 (DQ8)	13,3
Type I diabetes mellitus	- DQB1*02, DQA1*05 - DQB1*03:02, DQA1*03:01	10
Multiple sclerosis	-DQ6	4
Rheumatoid arthritis	-DR4	4

# ANKYLOSING SPONDYLITIS (AS, M. BECHTĚREV)

- ❖ Asociace s HLA-B27
- ❖ zánětlivá forma artritidy, postižení ve větší míře mladí muži
- ❖ postižení začíná obvykle v dolní části páteře, kde zánět napadá kloubní spojení mezi pánevní a páteří , nemoc se může postupně šířit nahoru a dolů ke kyčelním a kolenním kloubům.
- ❖ různý průběh onemocnění, může končit velmi vážnými deformitami
- ❖ průběh onemocnění dlouhodobý
- ❖ ostatní choroby asociované s HLA-B27 – Reiterova choroba (revmatické onem., často vyvolávají chlamydie, trojice obtíží: neinf.zánět kloubů, moč.trubice a spojivek)
- ❖ Anterior uveitis (přední uveitida-zánět duhovky, řasnatého tělíska)

## TYPE I DIABETES MELLITUS ( IDDM )

- ❖ silná asociace s DQA1\*05:01/DQB1\*02:01 a DQA1\*03:01/DQB1\*03:02 v kavkazské populaci  
DQA1\*05:01/DQB1\*02:01 u amerických černochoů  
DQA1\*05:01/DQB1\*03:02, DQA1\*03:01/DQB1\*04:01, DQA1\*03:01/DQB1\*03:03 u Japonců
- ❖ protektivní účinek vůči IDDM je asociován s DQB1\*06:02 (DQA1\*01:02/DQB1\*06:02 )
- ❖ IDDM se vyvíjí postupně, dlouhá subklinická etapa spojená s postupujícím poškozením beta buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu, které tvoří inzulin, klinický projev – zničeno asi 90% buněk
- ❖ za rozvoj onemocnění zodpovědno více faktorů – geny a negenetická složka ( infekce enteroviry = polioviry, coxsackieviry A, B, echoviry )
- ❖ většina nákaz virem je asymptomatická



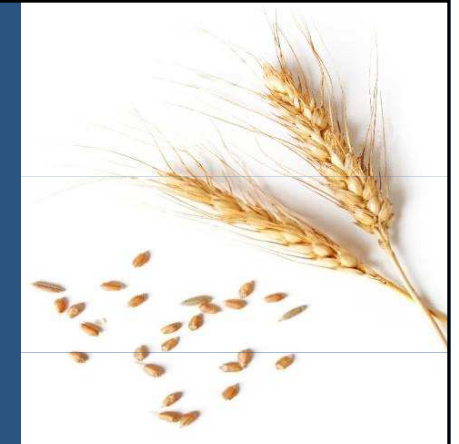
# CELIAC DISEASE (CD)

-predispoziční haplotypy

**-DRB1\*03- DQA1\*05:01- DQB1\*02:01**

**-DRB1\*07- DQA1\*02:01- DQB1\*02:02**

**-DRB1\*04 -DQA1\*03:01-DQB1\*03:02**



- ❖ geneticky podmíněné autoimunitní onemocnění
- ❖ intolerance na gluten (lepek), trávicí soustava pacienta není schopna trávit potraviny obsahující lepek
- ❖ chronický zánět sliznice tenkého střeva, prevalence v ČR 1 : 200-250 obyv.
- ❖ pro vývoj onemocnění nutné 3 podmínky:
  1. genetické předpoklady
  2. konzumace stravy obsahující lepek
  3. spouštěč onemocnění ( stres, trauma, virová infekce )
- ❖ dlouhodobé průjemy, únava, bolesti kostí, břicha, svalů, u dětí také problémy se zuby, růstem a vývojem
- ❖ jediná známá léčba – celoživotní dodržování bezlepkové diety

## MULTIPLE SCLEROSIS (MS)

- ❖ slabší asociace s HLA alelami DRB1\*15:01, DQB1\*06:02 a DQA1\*01:02
- ❖ vliv faktory genetické i negenetické (vliv prostředí, neznámé imunologické procesy)
- ❖ chronické zánětlivé demyelinizující onemocnění centrálného nervového systému s nejasnou etiologií a patogenezi

## NARKOLEPSIE

- ❖ neurologické **onemocnění**, v ČR 2500-5000 osob
- ❖ hypersomie – zvýšená denní spavost někdy doprovázená kataplexií (ochabnutí kosterního svalstva)
- ❖ pravděpodobně autoimunitní onemocnění s dědičným sklonem nastartované vnějším faktorem (streptokoková infekce) namířené proti hypocretinovým neuronům, které mají budivou funkci

# HLA nomenklatura

## 1. Serologická definice HLA antigenů – maximálně 2 znaky

- ❖ antigeny základní – např. **A9, A10, B51, B40, Cw3, DR2, DQ3....**
- ❖ antigeny splitové (subtypy) - sdílejí společné sérologicky definované epitopy

např. **A10** → **A25, 26, 34**

**B40** → **B60, 61**

**Cw3** → **Cw9, 10**

**DR2** → **DR15, 16**

**DQ3** → **DQ7, 8, 9**

- ❖ antigeny obecné – **DR51, DR52, DR53**

V r. 1987 – 10th International Histocompatibility Workshop, přijata nomenklatura založená na následujících principech:

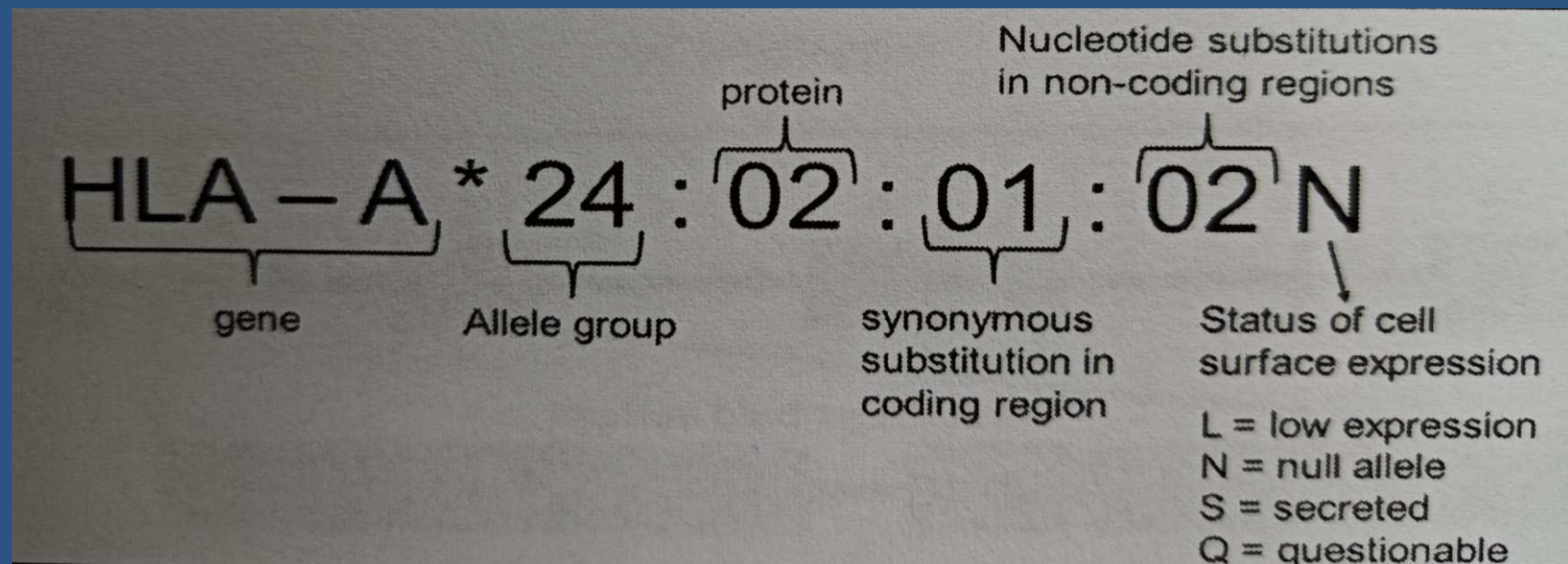
- ❖ **HLA**= Hlavní histokompatibilní komplex člověka
- ❖ **A, B, C, DR, DQ, DP.....** lokusy
- ❖ **číslo (A1, Cw3)** = označení specifity molekuly (antigenu)

## 2. Molekulárně-genetická definice HLA alel

používá znaky dvou a vícemístné

**HLA-A\*02, \*31, B\*08, \*44, C\*02, \*12, DRB1\*04, \*13, DQB1\*03, \*08**  
- úroveň „low resolution“

**HLA-A\*01:01, \*02:02, B\*07:01, \*35:01, C\*02:02, \*03:03, DRB1\*04:01, \*13:05,  
DQB1\*03:04, \*03:05**  
- úroveň „high resolution“



Někdy více jak 4 znaky:

**C\*02:02:01**, **\*02:02:02**.....alely se liší v tiché nukleotidové substituci na úrovni DNA, ne v aminokyselinové sekvenci na úrovni polypeptidu (tichá mutace)

**A\*24:02:01:01**      7. a 8. pozice – polymorfismus v nekódující oblasti

**A\*24:02:01:02L**      „ low expressed“ allele

**B\*51:11N**      „ null“ allele

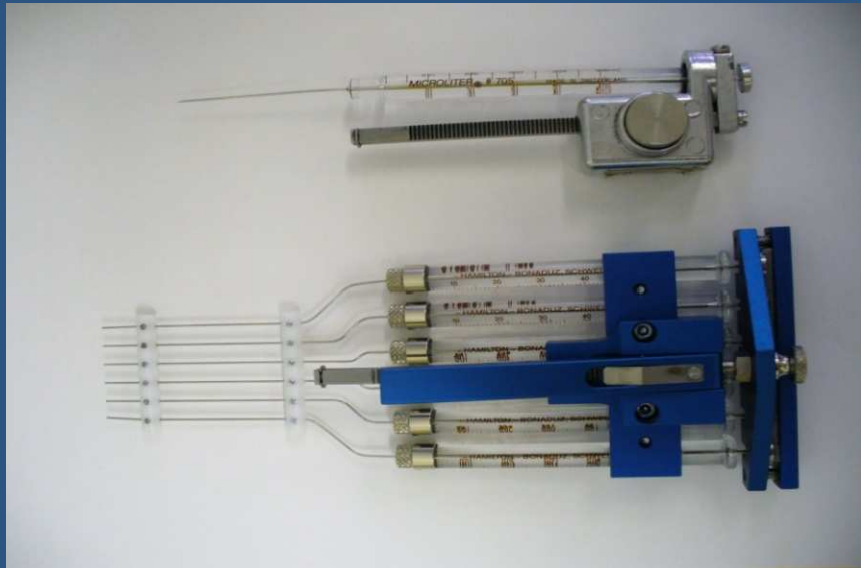
# Metody typizace HLA antigenů

## 1. serologické metody

### **Complement –Dependent Cytotoxicity Assay ( CDC) = Lymfocytotoxický test ( LCT )**

- ❖ lymfocyty typovaného jedince jsou nejdříve inkubovány se specifickými antiséry, která jsou rozkapána na mikrotitračních plotnách
- ❖ přidáno králičí sérum jako zdroj komplementu
- ❖ vazba protilátky se specifickým HLA antigenem na membráně lymfocytu aktivuje komplement, který poškozují buněčnou membránu
- ❖ vitální barvení ( trypanová modř, eosin ), mrtvé buňky se obarví
- ❖ mikroskopické hodnocení, hodnotí se procento obarvených ( mrtvých ) buněk, síla reakce -, 2, 4, 6, 8
- ❖ nehodnotitelný výsledek - 0







S2505/15



S2505/15





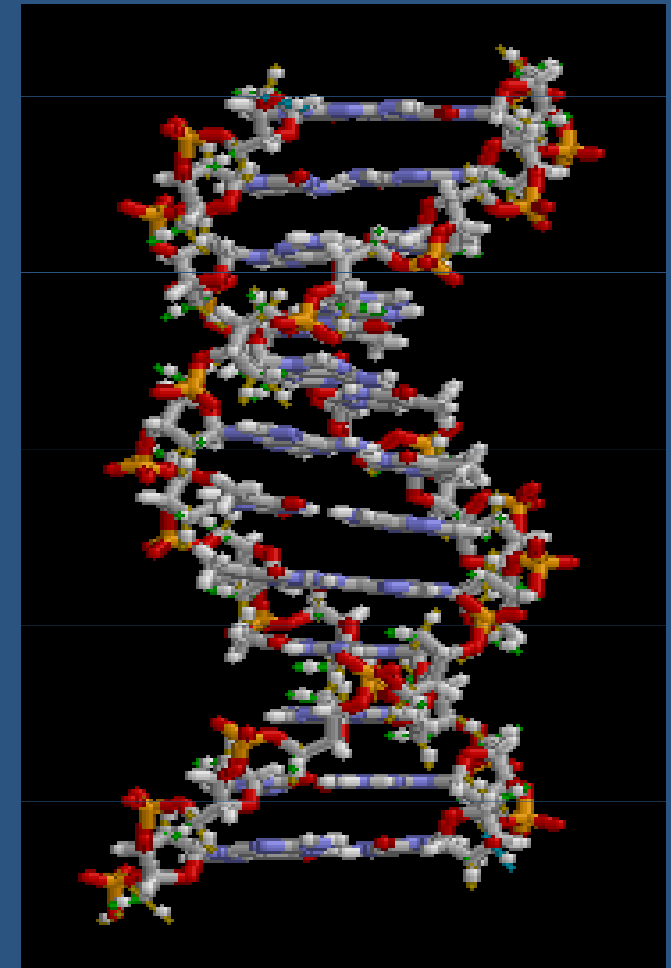
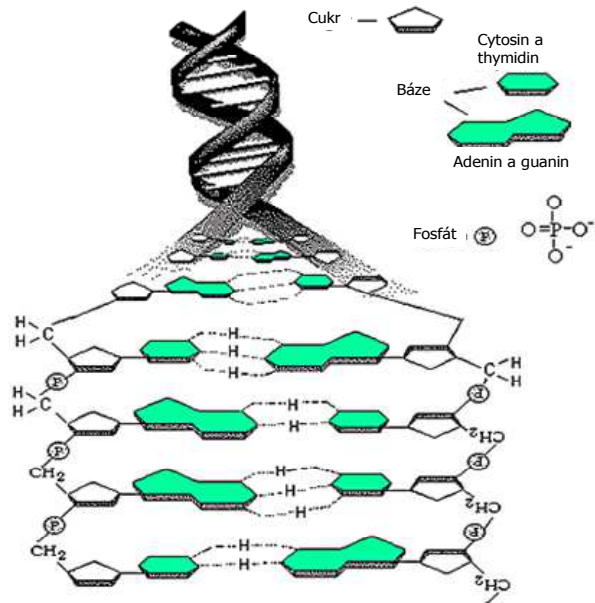
## 2. molekulárně-genetické metody

**PCR** – enzymatická metoda in vitro, která slouží k namnožení ( amplifikaci ) specifického úseku DNA vymezeného párem specifických primerů.

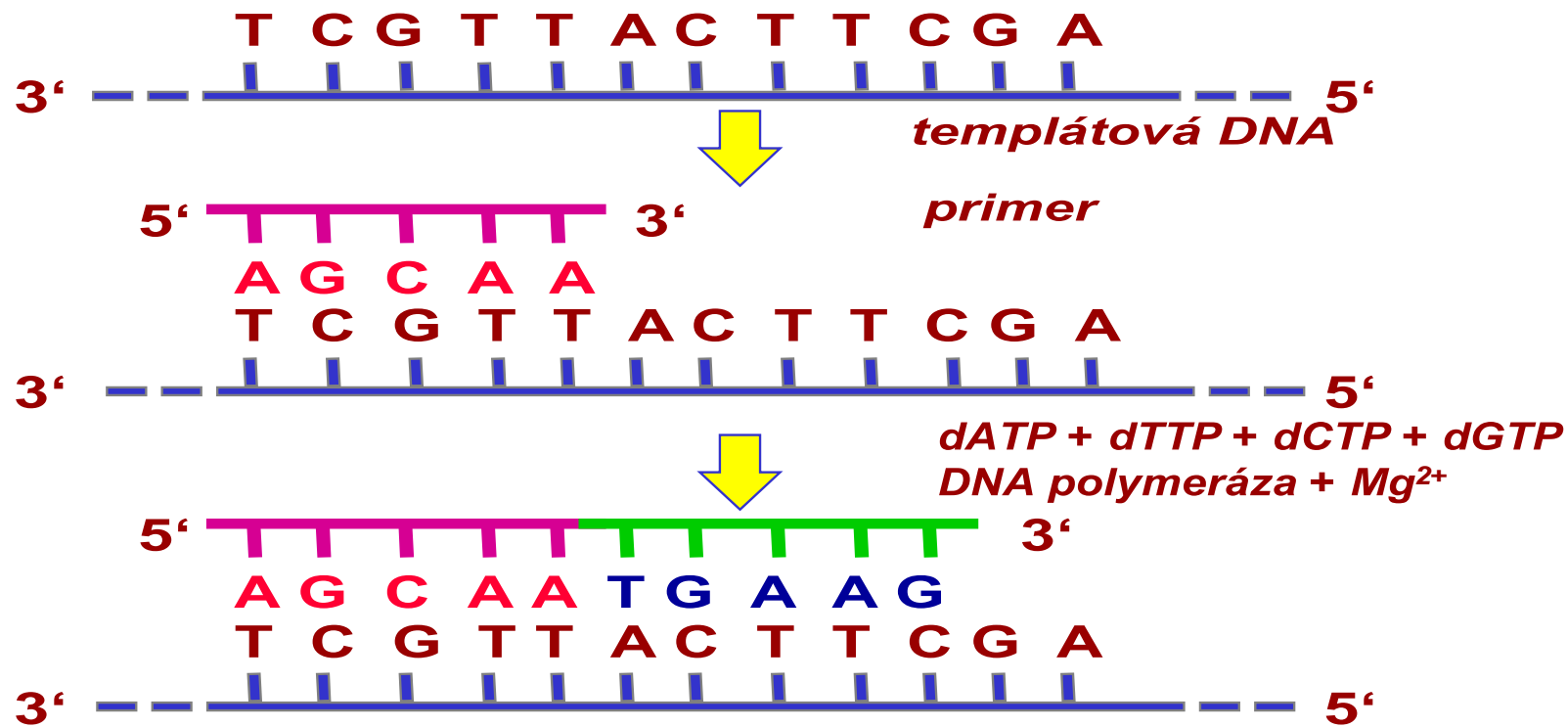
3 kroky – **izolace DNA** ( plná krev, buňky stěry, krevní skvrny, vlasové folikuly, parafínové tkáňové bloky)

- amplifikace DNA ( PCR )
- detekce PCR produktu

Počet kopií DNA -  $2^n$   
n – počet cyklů ( 30 – 35)



# PCR - *elongace primerů*



## HLA typizace pomocí PCR metod

PCR – SSP ( sequence – specific priming)

PCR – SSO ( sequence – specific oligonukleotide probes )

PCR – SBT ( sequence based typing )

Real-Time PCR

NGS – sekvenování nové generace



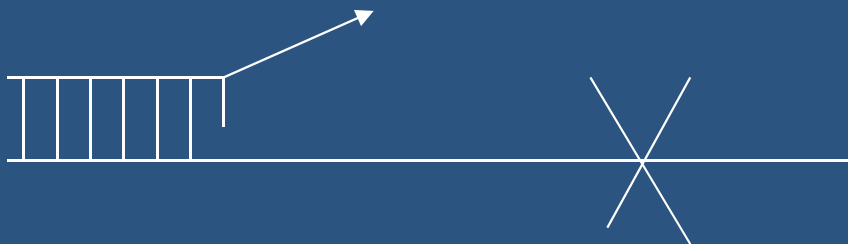
## 1. PCR – SSP

- ❖ jednotlivé páry primerů určují jednu alelu nebo skupinu alel (alelově a skupinově specifické primery), rozlišení během PCR
- ❖ tolik primerových párů, aby mohly být amplifikovány a detekovány všechny známé alely daného lokusu
- ❖ PCR – SSP může být užita pro „low resolution“ nebo „high resolution“
- ❖ HLA typizace „low resolution“ pro lokusy -A, -B, -DR, -DQ vyžaduje 95 – 100 primerových párů
- ❖ v každé zkumavce tzv. interní kontrola amplifikace
- ❖ kontrola kontaminace – zkumavka obsahuje všechny reagenty pro PCR kromě templátové DNA
- ❖ Detekce elektroforeticky, amplikony s menší molekulovou hmotností migrují v gelu rychleji než amplikony s vyšší molekulovou hmotností
- ❖ vizualizace – obarvení gelu fluorescenční barvou, která se inkorporuje do DNA, expozice gelu UV světlem na transiluminátoru
- ❖ fotodokumentace

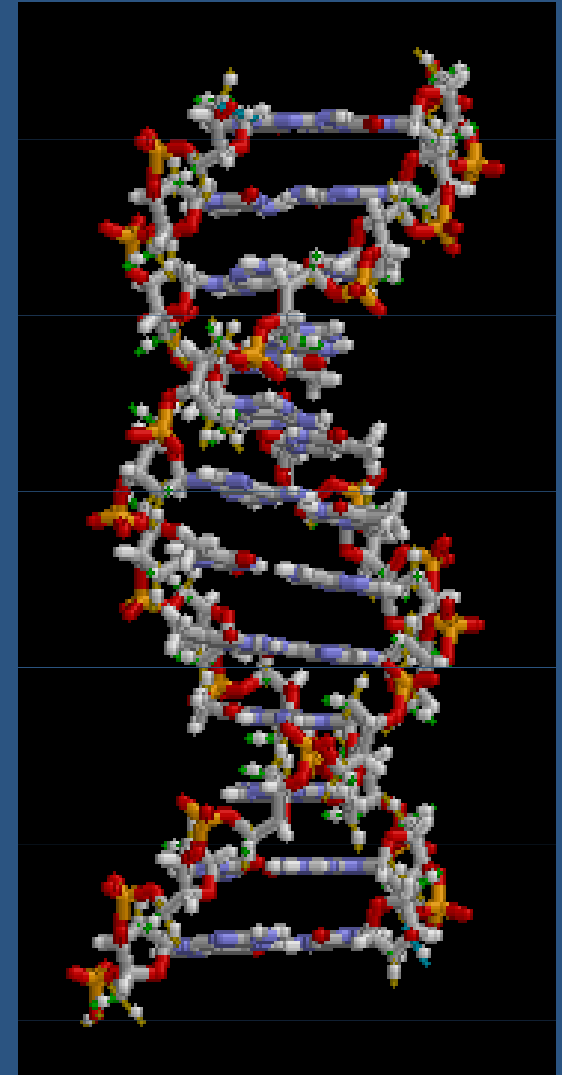
# Princip SSP-PCR

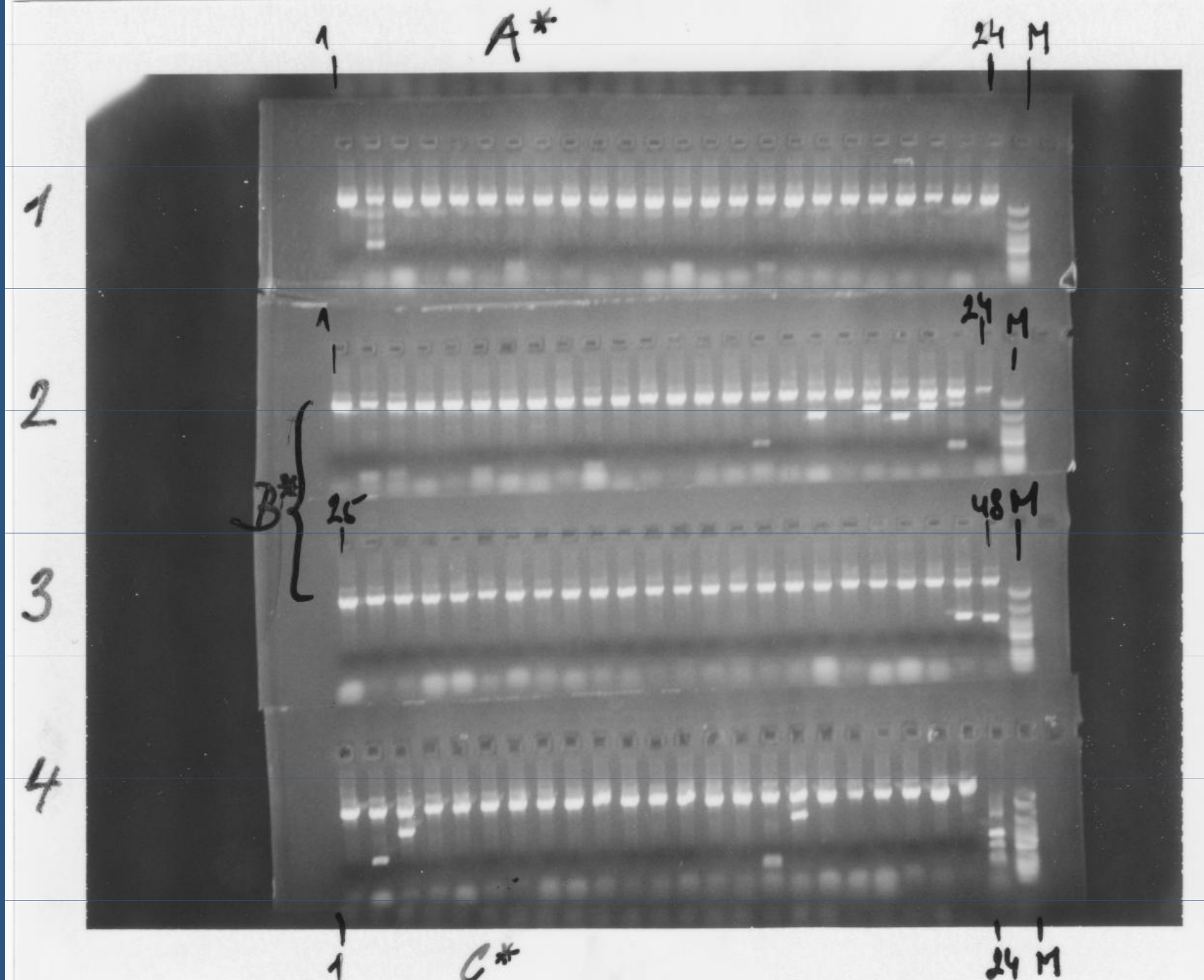


úplná shoda – amplifikace proběhne



neshoda – amplifikace neproběhne

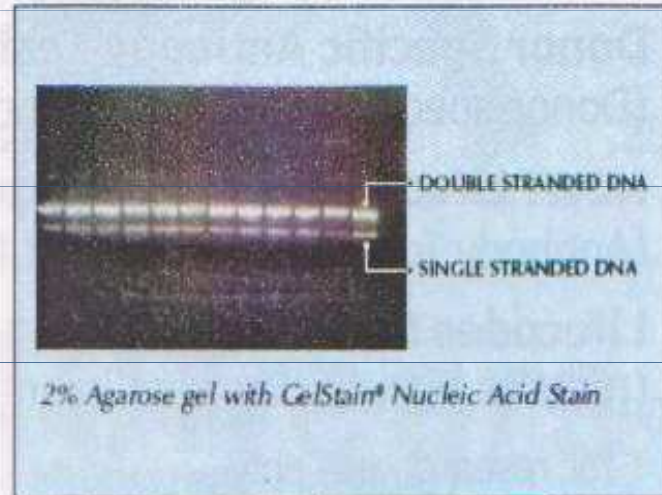
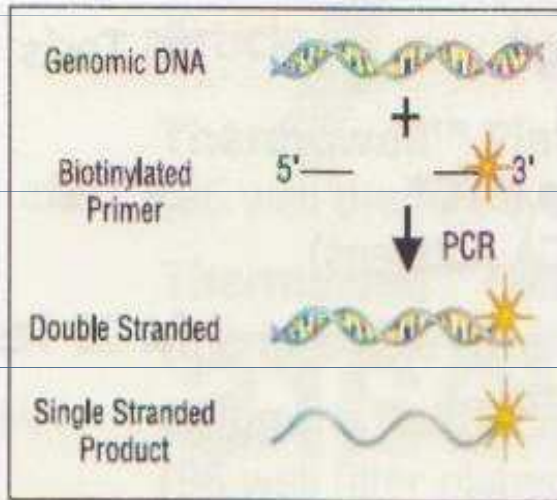




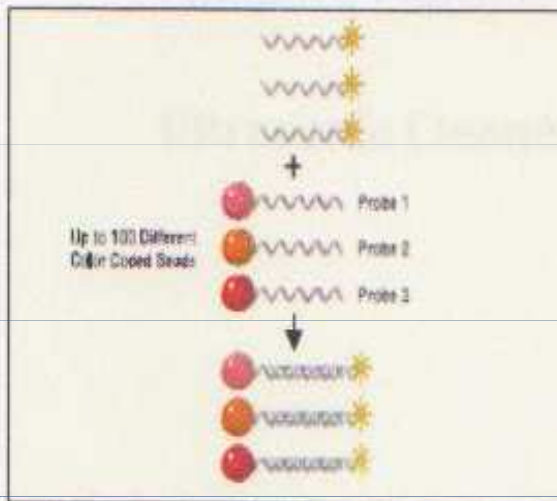


## 2. PCR-SSO typizace na analyzátoru Luminex

(for 100 typings)



1. Amplify with biotinylated primers



2. Hybridize with beads

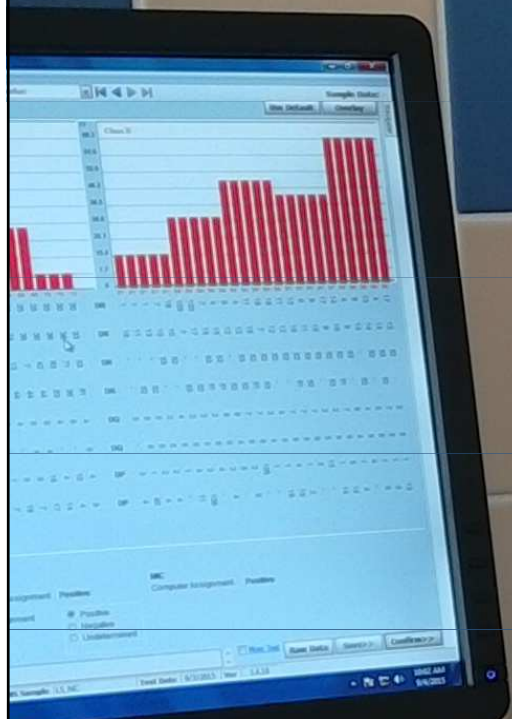


3. Label with SA-PE

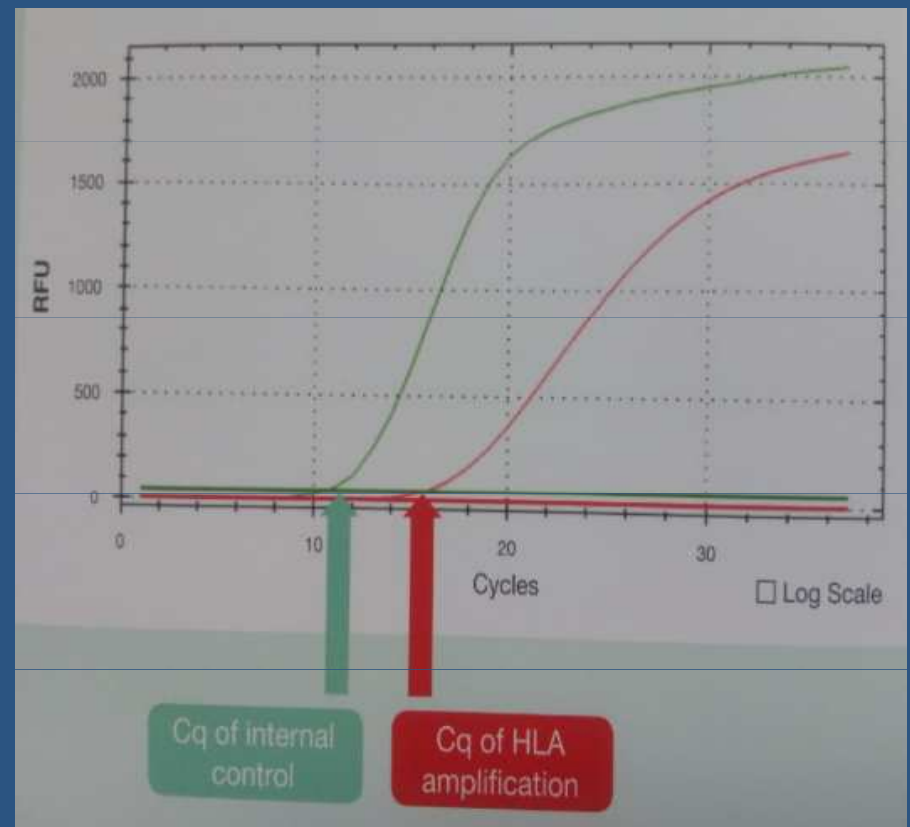
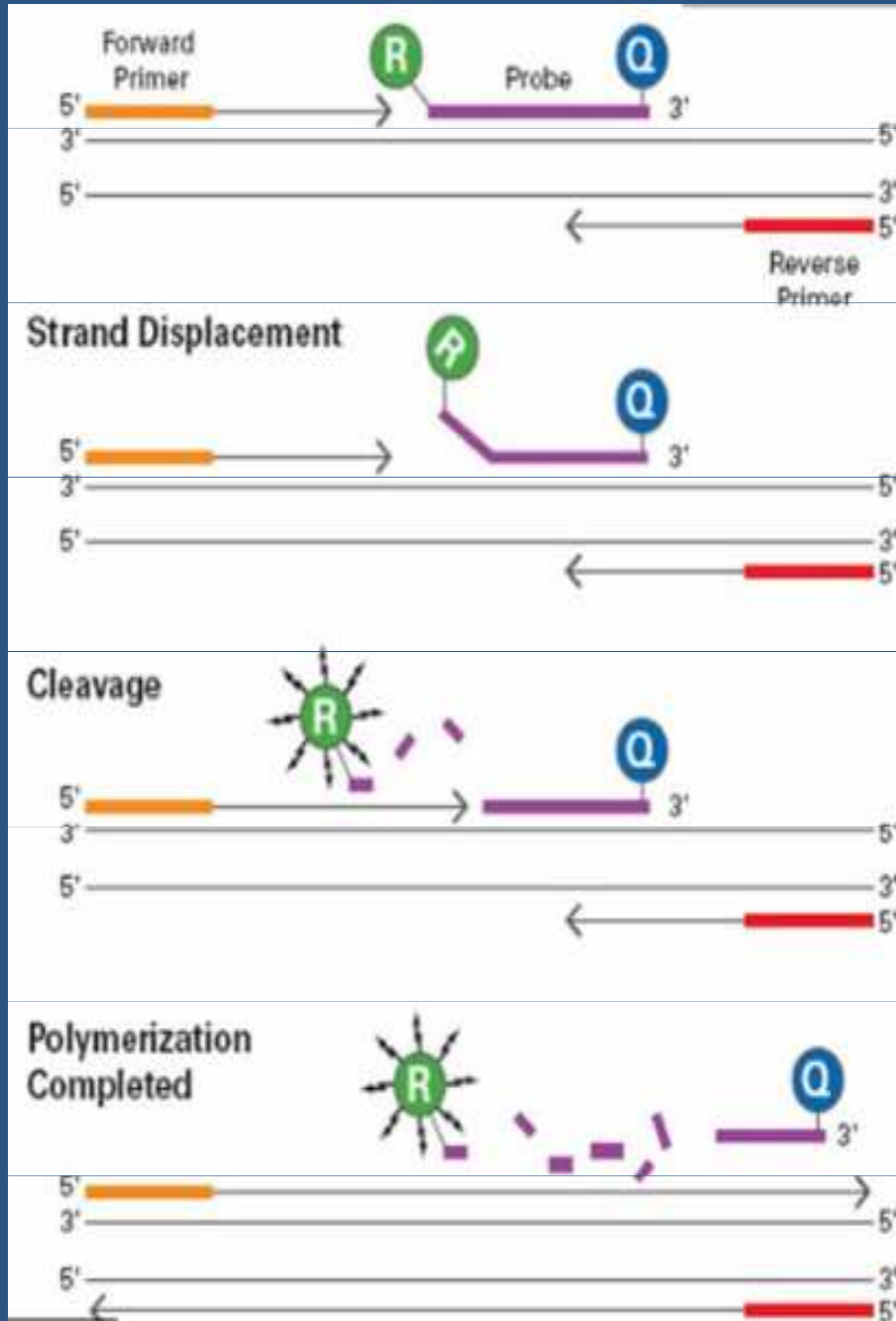


4. Analyze in the fluoroanalyzer





# 3. Real-Time PCR



## 4. PCR – SBT

- ❖ použití ddNTPs ( dideoxy nucleotide triphosphates, chybí 3'-OH skupina ), které fungují jako terminátory PCR reakce
- ❖ ddNTPs značeny 4 různými fluorescenčními barvivy, PCR probíhá v 1 zkumavce a elfo v 1 linii
- ❖ sekvenátor – probíhá kapilární elektroforéza, produkty rozdělovány podle velikosti (rozdíly v délce o 1 nukleotid), laserový paprsek snímá koncový fluorescenčně značený ddNTP
- ❖ interpretace výsledků pomocí softwaru

## 5. NGS = sekvenování nové generace

- ❖ amplifikace
- ❖ příprava genové knihovny
- ❖ příprava templátu
- ❖ sekvenování
- ❖ analýza





~ 3.5 hr



~ 6.5 hr



~ 2 hr



~ 9 hr



### AMPLIFICATION

NXType™ amplification

### LIBRARY PREPARATION

Barcode library creation

### TEMPLATE PREPARATION

Isothermal clonal amplification onto Ion Sphere Particles™

### SEQUENCING

Load Ion™ chip and run PGM™

### ANALYSIS

TypeStream™ Software analyzes automatically

Day 1

Day 2

Day 3

## Full workflow < 3 days

#### Competitive Advantages

Turn-key Solution

Multiplexed primer design (reduces library prep)

Short PCR Time (~ 1.5 hours)

Suitable for Low to High throughput (≤ 48 samples / run)

Auto-analysis with TypeStream software plug-in

Sample-to-Results

< 3 Days

#### Unique

Workflow



Library Prep



Library Prep

Workflow

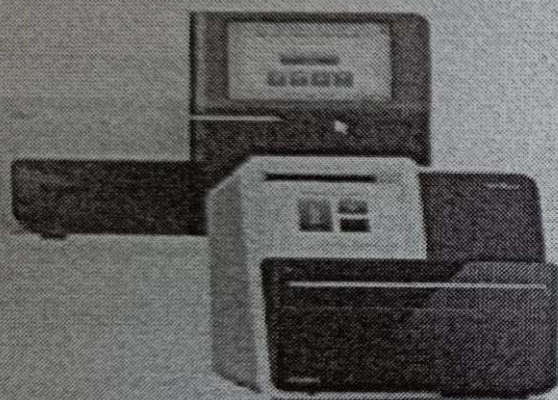
Analysis



Workflow

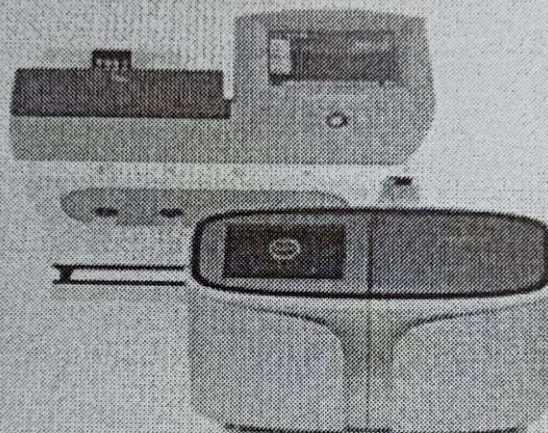


### Illumina MiSeq



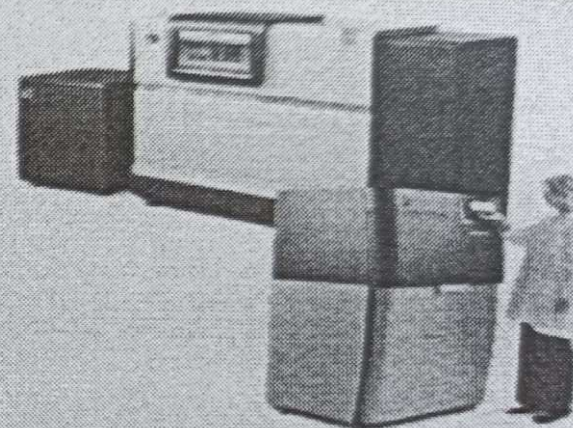
MiniSeq

### Ion Torrent PGM



S5

### Pacific Biosciences RSII



Sequel